

アンジオテンシン II 受容体における アゴニスト非依存的活性化の機序と病因的役割

大阪大学大学院 医学系研究科 循環器内科学
赤澤 宏

1. はじめに

アンジオテンシン II (AngII)1 型 (AT₁) 受容体は 7 回膜貫通型の G 蛋白質共役型受容体 (G protein-coupled receptor: GPCR) ファミリーに属し、血圧や水・電解質の恒常性の維持とともに、組織レベルでは心血管系細胞の増殖や肥大、線維化を促進するなど、心血管リモデリングの病態に深く関与している。従来、GPCR はアゴニストとの結合によってのみ活性化すると考えられてきたが、AT₁ 受容体はアゴニスト非存在下でも自律的活性を示すことや¹⁻³、伸展刺激というメカニカルストレスによっても活性化することが^{4,6}、最近明らかとなっている。さらに、アゴニストに依存しない AT₁ 受容体の活性を用量依存的に低下させる薬理的指標として、AT₁ 受容体ブロッカー (ARB) のインバースアゴニスト活性がクローズアップされている。強力なインバースアゴニスト活性を有する ARB はアゴニスト依存的な受容体活性化と非依存的な受容体活性化をともに抑制するので、臓器保護作用も高いと想定される。マウスモデルでは、血行力学的負荷という伸展刺激による AT₁ 受容体の活性化が AngII 非依存的に心肥大形成を促進すること、さらにこのような心肥大形成がインバースアゴニスト活性を有する ARB によって抑制されることが明らかとなっている⁴。しかし、AT₁ 受容体の自律的活性が疾患形成においてどのような病因的役割を果たしているのか、生体レベルで実験的に証明されていない。

本研究では、アゴニスト非依存的な AT₁ 受容体の自律的活性が心臓リモデリングの病態形成に関わるか、マウスを用いた検討を行った。

2. 方法

- マウスの作成と心機能評価： *α-myosin heavy chain* プロモーター下に心筋特異的に AT₁ 受容体を過剰発現する AT₁Tg マウス⁷ と、アンジオテンシノーゲンノックアウト (AgtKO) マウス⁸ とを交配し、AT₁Tg-AgtKO マウスを作成した。この AT₁Tg-AgtKO マウスでは、心筋特異的に AT₁ 受容体が過剰発現しているが、全身性に AngII の産生が見られない。心機能は、無麻酔下に心エコー法 (Vevo 770 Imaging System, 25 MHz プローブ, Visual Sonics) によって評価した。また、心臓組織は、ホルマリン固定後にパラフィン包埋、薄切し、HE 染色および Masson trichrome 染色にて組織学的な評価を行った。
- AngII 投与と血圧測定： AngII は生理食塩水に溶解し、8 週齢の C57BL/6 マウスに 0.6 mg/kg/day の用量で浸透圧ポンプ (ALZET model 2002, Durent Corp) を用いて 2 週間の持続的皮下投与を行った。血圧は tail cuff 法により非侵襲的に測定を行った (BP-98A, Softron)。
- Real time PCR： 心臓組織より total RNA を抽出し (RNeasy Kit, Qiagen)、cDNA を作成し (QuantiTect Reverse Transcription Kit, Qiagen)、Universal ProbeLibrary Assay 法 (Roche Applied Science)

によりreal-time PCRを行った。

- ウェスタンブロット法：心臓組織から蛋白質を抽出し、膜分画と細胞質分画に分離し、SDS-PAGEを行い、以下の1次抗体を用いてウェスタンブロットを行った。ウサギ抗 $G\alpha_{q/11}$ ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、マウス抗 α -tubulinモノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich)、ウサギ抗リン酸化ERK1/2ポリクローナル抗体 (Cell Signaling Technology)、ウサギ抗ERK1/2ポリクローナル抗体 (Invitrogen)。

3. 結果・研究成果

- AT_1Tg -AgtKOマウスの心臓では、 AT_1 受容体の自律的活性が亢進している。

抗リン酸化ERK1/2抗体を用いてERK1/2のリン酸化レベルをウェスタンブロット法で比較したところ、 AT_1Tg -AgtKOマウスではAgtKOマウスよりも心臓でのERK1/2のリン酸化が亢進していた。また、抗 $G\alpha_{q/11}$ 抗体を用いて膜分画および細胞質分画での $G\alpha_{q/11}$ の発現レベルを比較したところ、 AT_1Tg -AgtKOマウスではAgtKOマウスよりも心臓での $G\alpha_{q/11}$ の細胞質分画への再分布が亢進していた。以上より、 AT_1Tg -AgtKOマウスの心臓では、 AT_1 受容体の自律的活性が亢進していることが示唆された。

- AT_1Tg -AgtKOマウスは心機能低下と心室拡大、間質の線維化を示す。

AT_1Tg -AgtKOマウスはAgtKOマウスと比べて血压には差が見られなかったが、進行性の心機能低下と心室拡大が心エコー法によって認められた。また、Masson trichrome染色による組織学的検討を行ったところ、 AT_1Tg -AgtKOマウスでは間質の著明な線維化を認めた。さらに、 AT_1Tg -AgtKOマウスでは、心臓における胎児性遺伝子 (*Nppa*, *Nppb*, *Acta1*) や細胞外基質遺伝子 (*Col3a1*, *Postn*) の発現が亢進していた。以上より、 AT_1Tg -AgtKOマウスでは、 AT_1 受容体の自律的活性がAngII非依存的に心臓リモデリングを促進させていることが示唆された。

- AT_1Tg -AgtKOマウスの心臓リモデリングは、インバースアゴニスト活性の高いARBにより抑制される。高いインバースアゴニスト活性を有するカンデサルタンと、イミダゾールリングに存在するカルボキシル基を欠失することでインバースアゴニスト活性が低いカンデサルタン誘導体 (カンデサルタン7H) とで、 AT_1Tg -AgtKOマウスにおける心臓リモデリングに対する治療効果に違いがあるか、検討した。まず、C57BL/6マウスにAngII (0.6 mg/kg/day)を2週間持続投与行くと、有意な血压上昇が見られるが、カンデサルタン (1 mg/kg/day)の経口投与によって血压上昇は抑制された。カンデサルタン7Hは同じ用量では血压低下作用を發揮しなかったが、20 mg/kg/dayの投与ではカンデサルタンと同等に血压を低下させた。一方、カンデサルタンは AT_1Tg -AgtKOマウスにおける心臓リモデリングの進展を抑制したのに対して、カンデサルタン7Hは20 mg/kg/dayの投与量でも心臓リモデリングの進展を抑制しなかった。これらの結果から、 AT_1 受容体ブロッカーのインバースアゴニスト活性は、自律的活性の亢進によって生じる臓器障害に対して有効性を發揮することが示唆された。

4. 考察・まとめ

本研究により、AngIIが存在しない場合でも、心筋で AT_1 受容体の発現が亢進すると、その自律的活性によって、心臓リモデリングが促進することが証明された。GPCRの自律的活性は培養細胞系ではよく知られた現象であるが、生体内では内因性のアゴニストによる作用を排除することが難しく、その病態生理学的意義については不明な点が多く残されていた。様々な心疾患モデルで心臓における AT_1 受容

体の発現レベルは亢進していることから、ヒトにおいてもAT₁受容体の自律的活性は何らかの病因的役割を果たしていると考えられる。このようなアゴニストに依存しない受容体活性化は理論的にアンタゴニストでは抑制できず、インバースアゴニストによってのみ抑制される。実際に、AT₁Tg-AtgK0マウスにおける心臓リモデリングの進行は、インバースアゴニストであるカンデサルタンによって抑制された。本研究の成果は、GPCRの自律的活性の生体における役割に関する最初のproof-of-principleであり、GPCRを標的とする創薬や薬物治療に対しても大きなインパクトを与えると期待される。

5. 発表論文・参考文献

発表論文：

1. Akazawa H, Yasuda N, Miura S, Komuro I. Assessment of Inverse Agonism for the Angiotensin II Type 1 Receptor. *Methods Enzymol.* 2010;485:25-35.
2. Liao CH, Akazawa H, Tamagawa M, Ito K, Yasuda N, Kudo Y, Yamamoto R, Ozasa Y, Fujimoto M, Wang P, Nakauchi H, Nakaya H, Komuro I. Cardiac mast cells cause atrial fibrillation through PDGF-A-mediated fibrosis in pressure-overloaded mouse hearts. *J Clin Invest.* 2010;120(1):242-253.
3. Naito AT, Okada S, Minamino T, Iwanaga K, Liu ML, Sumida T, Nomura S, Sahara N, Mizoroki T, Takashima A, Akazawa H, Nagai T, Shiojima I, Komuro I. Promotion of CHIP-mediated p53 degradation protects the heart from ischemic injury. *Circ Res.* 2010;106(11):1692-1702.
4. Shimizu I, Minamino T, Toko H, Okada S, Ikeda H, Yasuda N, Tateno K, Moriya J, Yokoyama M, Nojima A, Koh GY, Akazawa H, Shiojima I, Kahn CR, Abel ED, Komuro I. Excessive cardiac insulin signaling exacerbates systolic dysfunction induced by pressure overload in rodents. *J Clin Invest.* 2010;120(5):1506-1514.

参考文献：

1. Yasuda N, Miura S, Akazawa H, Tanaka T, Qin Y, Kiya Y, Imaizumi S, Fujino M, Ito K, Zou Y, Fukuhara S, Kunimoto S, Fukuzaki K, Sato T, Ge J, Mochizuki N, Nakaya H, Saku K, Komuro I. Conformational switch of angiotensin II type 1 receptor underlying mechanical stress-induced activation. *EMBO Rep.* 2008;9(2):179-186.
2. Qin Y, Yasuda N, Akazawa H, Ito K, Kudo Y, Liao CH, Yamamoto R, Miura S, Saku K, Komuro I. Multivalent ligand-receptor interactions elicit inverse agonist activity of AT(1) receptor blockers against stretch-induced AT(1) receptor activation. *Hypertens Res.* 2009;32(10):875-883.
3. Akazawa H, Yasuda N, Komuro I. Mechanisms and functions of agonist-independent activation in the angiotensin II type 1 receptor. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;302(2):140-147.
4. Zou Y, Akazawa H, Qin Y, Sano M, Takano H, Minamino T, Makita N, Iwanaga K, Zhu W, Kudoh S, Toko H, Tamura K, Kihara M, Nagai T, Fukamizu A, Umemura S, Iiri T, Fujita T, Komuro I. Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nat Cell Biol.* 2004;6(6):499-506.

5. Mederos y Schnitzler M, Storch U, Meibers S, Nurwakagari P, Breit A, Essin K, Gollasch M, Gudermann T. Gq-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction. *EMBO J*. 2008;27(23):3092-3103.
6. Rakesh K, Yoo B, Kim IM, Salazar N, Kim KS, Rockman HA. beta-Arrestin-biased agonism of the angiotensin receptor induced by mechanical stress. *Sci Signal*. 2010;3(125):ra46.
7. Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis FW, Thibault G, Nemer M. Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(2):931-936.
8. Tanimoto K, Sugiyama F, Goto Y, Ishida J, Takimoto E, Yagami K, Fukamizu A, Murakami K. Angiotensinogen-deficient mice with hypotension. *J Biol Chem*. 1994;269(50):31334-31337.